

◇◇ 上海第一医学院 ◇◇

医学遗传学实验指导



医学遗传学(研究生班)实验指导

目 录

实验一	果蝇单性状遗传试验 - - - - -	1
实验二	果蝇的伴性遗传 - - - - -	3
实验三	遗传病的家谱分析 - - - - -	4
实验四	遗传性疾病的快速诊断 - - - - -	6
实验五	人体微量血淋巴细胞的培养与染色体标本的 制备技术 - - - - -	8
实验六	正常人染色体核型的观察与分析 - - - - -	9
实验七	X小体(X染色质)与Y-小体(Y染色质) 标本的制备与观察 - - - - -	12
实验八	人类皮肤纹理的观察 - - - - -	15

实验一 果蝇单性状遗传试验

目的与要求

通过实验，验证孟德尔式的遗传法则——3 : 1 分离定律。

实验材料与器材

一、野生型果蝇 (Wild type)

残翅果蝇 (Vestigial)

二、用具：双筒解剖镜，小号牛奶并，麻醉并，白磁板，海绵板，解剖针，毛笔，镊子，乙醚，棉球。

三、饲料：红糖，麸皮，洋菜，玉米，干酵母等。

四、果蝇的麻醉与雌雄识别

对果蝇进行检查时，可用乙醚麻醉，使其保持静止状态，因果蝇对乙醚很敏感，极易麻醉，麻醉的深度视实验要求而定（种蝇以轻度麻醉为宜，观察用蝇可深度麻醉，致死也不妨，果蝇翅膀外展45°角即表示已死亡）。麻醉后的果蝇放在白瓷板上检查，完毕后倒入煤油或酒精并（死蝇盛留器）中。

果蝇有雌雄之分，幼虫期区别较难，成虫区别容易。雄性的腹部环纹5节，末端钝而圆，颜色深，在解剖镜下可看到第一节足底侧最上部足前端表面有黑色鬃毛流苏称性梳 (Sex combs)。雌性腹部环纹7节，末端尖，颜色浅，跗节前端无黑色鬃毛流苏。

实验步骤

一、选残翅果蝇 (Vg) 和野生型果蝇 (+) 为亲本，两种果蝇均可作父本或母本，但母本一定要选用处女蝇，培养两并，每并5 - 6对，记作P。

二、7 - 8天后，移去亲本果蝇。

三、待F₁成虫出来后，观察F₁个体的翅膀。

四、在一个新鲜培养并内，放5或6对F₁果蝇，这里雌蝇不必再用处女蝇。

五、7 - 8天后，移去F₁。

六、在F₂代果蝇出现后，鉴定有多少是野生型，有多少是残翅。

连续统计 7 - 8 天，被统计过的果蝇立即放到死蝇盛留器中。

记录格式

试验编号

开始日期

P 残翅 (vg) 雌 × 野生型 (+) 雄

F₁

统计日期	野生型果蝇 (+) 的数目

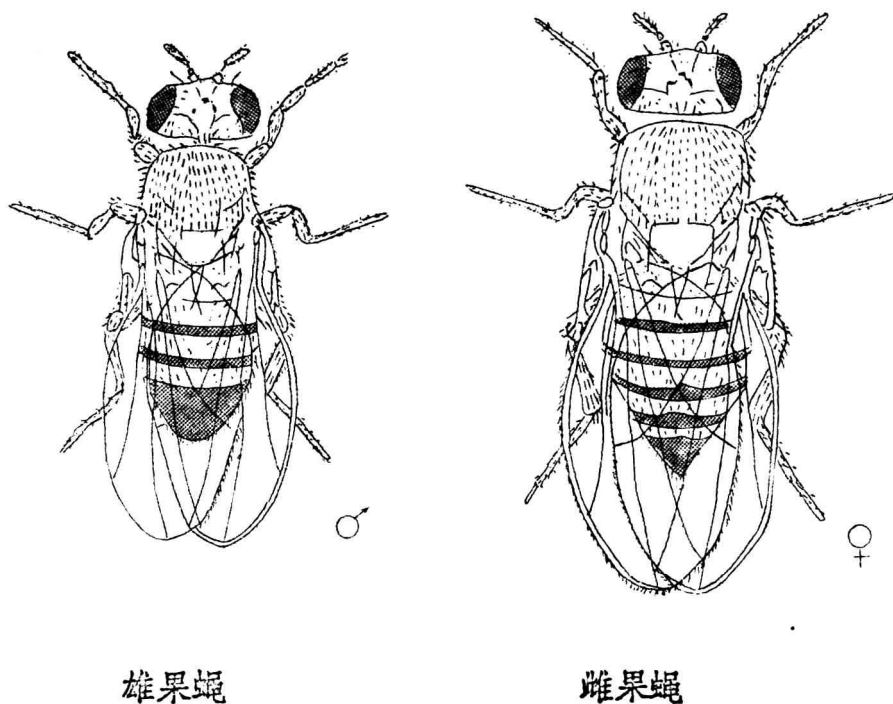
F₂

	果 蝇 数 目	
	+	vg
统计日期		
总 数		
百 分 数		

χ^2 测定吻合度

	野 生 型 (+)	残 翅 vg
(O) 实验观察数		
(C) 理论数 (3:1)		
(O-C) 偏差		
$\frac{(O-C)^2}{C}$		
$\chi^2 = \sum \frac{(O-C)^2}{C}$	P =	

附图：果蝇的外形：



实验二 果蝇的伴性遗传

目的与要求

了解伴性遗传和非伴性遗传的区别，以及了解伴性基因在正反杂交中的差异。

实验的原理

非伴性基因的杂种一代应表现显性性状；而伴性基因，在一定的杂交组合下，杂种一代会出现隐性性状。野生型果蝇为红眼（+），与之相对的突变型为白眼（w），红眼对白眼为显性。下图A为正交，B为反交。可见，以显性性状作为杂交组合的母本时，F₁代和非伴性遗传相同；若以隐性性状作为杂交组合的母本时，F₁代中的雄性表现为隐性性状。

A

红眼♀ 白眼♂

$X^+X^+ \times X^WY$

↓

精子 卵	X^W	Y
X^+	红眼♀ X^+X^W	红眼♂ X^+Y

B

白眼♀ 红眼♂

$X^WX^W \times X^+Y$

↓

精子 卵	X^+	Y
X^W	红眼♀ X^+X^W	白眼♂ X^WY

实验材料与器材

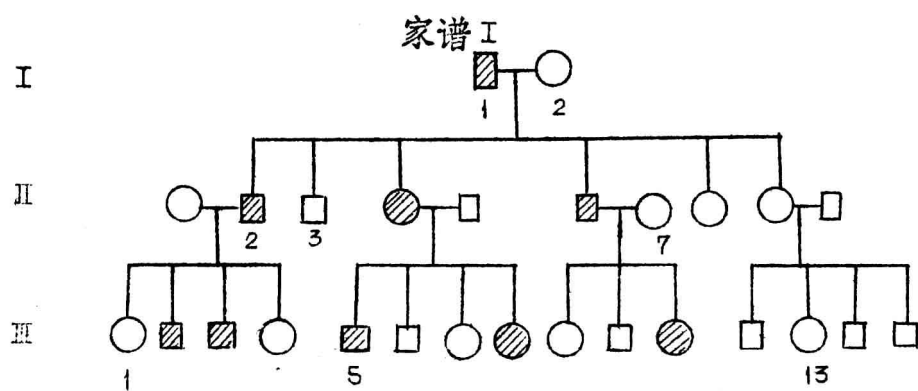
介剖鏡，果蠅實驗需要的一般用具，乙醚。

- 一、原种+和W果蝇品系分别做正反交（每种各作两并，每并雌雄蝇各3-5对。
- 二、置于25℃恒温箱，
- 三、一周后倒去亲本，
- 四、记载正反交结果（总数和百分数）
- 五、解释所得的结果。

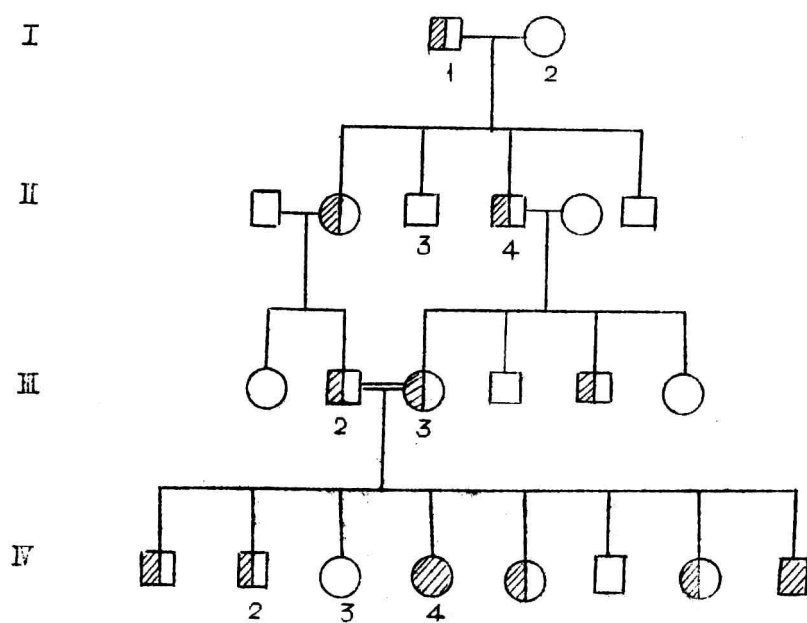
目的与要求

实验步骤

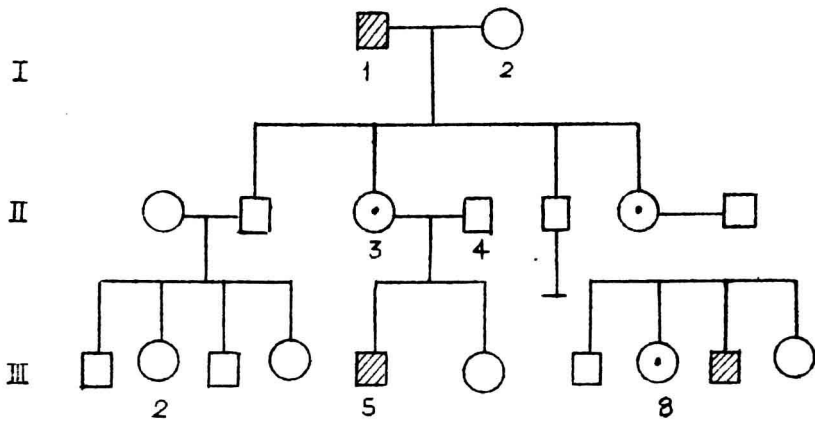
- 三 指出其传递方式及有关个体的基因型和表现型
三 归纳不同遗传方式之特点



家谱 II



家谱Ⅲ



实验四 遗传性疾病的快速诊断

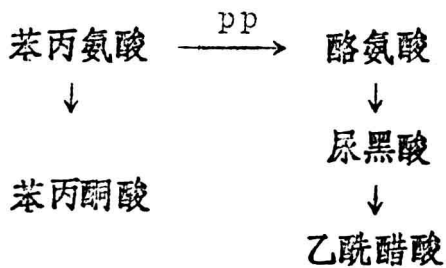
目的与要求

了解苯酮尿症 (PKU) 和 PTC 味盲的快速诊断法。

原理：

一 PKU 系常染色体隐性遗传

病人缺乏苯丙氨酸羟化酶，以致不能使摄入体内的苯丙氨酸转变为酪氨酸，即



含有苯丙酮酸的尿液一旦接触到快速诊断纸即呈现淡绿色~深灰兰色，且可根据颜色的深浅与标准色板相比较，由此得出尿液中苯丙酮酸的含量。

二 PTC 味盲 系常染色体隐性遗传

人们对苯基异硫脲 (Phenyl thio carbamide, PTC) 的反应不同, 有的人觉得这种化学品的味道是苦涩的, 称为尝味者 (taster) ; 有的人察觉不出这种化学品的味道, 称为味盲者 (non-taster) 、

实验材料与药品

PKU 半定量快速诊断纸, 苯丙酮酸结晶, 正常人尿

PTC 溶液 1 : 750000 , 1 : 24000 , 1 : 50000

实验步骤

PKU 快速诊断

称取苯丙酮酸结晶 10mg , 50mg 和 200mg 分别溶于 100ml 尿液中, 然后分别地把快速诊断纸插入以上溶液, 视其所呈现之颜色

PTC 味觉试验

每人分别地尝一下三种不同浓度的 PTC 溶液, 感觉如何?

记录格式

PKU 快速诊断纸

苯丙酮酸尿液浓度	诊断纸的显色反应
10mg / 100ml 尿	
50mg / 100ml 尿	
200mg / 100ml 尿	

PTC 味觉试验

PTC 浓度	味 觉
1 : 750000	
1 : 24000	
1 : 50000	

实验五 人体微量血淋巴 细胞的培养与染色体标本的制备技术

目的与要求

初步掌握人体微量血淋巴细胞的体外培养与制备常规染色体标本的方法

器材与溶液

2ml 灭菌注射器, 10ml 刻度离心管, 吸管, 试管架, 玻片, 100ml 量筒, 200ml 烧杯, 玻棒, 切片盒, 载玻片, 试剂瓶, 煤气灯(或酒精灯), 离心机, 搪瓷盘, 粗天平, 显微镜, 肝素, 生长培养基, 秋水仙素, 0.075M KCl, 甲醇, 冰醋酸, Giemsa 染色液。

实验步骤

一 采血

用 2ml 灭菌注射器吸取 0.2% 肝素液润湿管壁, 自肘静脉采血约 0.3-0.5ml, 并使之混合均匀(如有必要也可自指尖或耳垂采血)。每人培养 2 并。

二 接种与培养

将抗凝全血直接注入(通过橡皮塞)含有 5ml 生长培养基的二个培养并中, 摇匀后直立置 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱培养 48-72 小时(取决于研究的目的)。

生长培养基的组成是:

细胞培养液 (TC199, RPMI1640 或 MEM)	80%
小牛血清或人血清	18.5%
植物性血球凝集素 (PHA)	1.5%
青霉素	100 单位/毫升培养基
链霉素	100 微克/毫升培养基

以 1.4% NaHCO_3 液调节其 pH 为 7.2~7.4。

三 秋水仙素处理

在终止培养前 2-6 小时, 在无菌条件下加秋水仙素液一滴, 使

其最终浓度为 $0.2-0.4 \mu / \text{m}\ell$ 。摇匀继续置 37°C 恒温箱培养。

四 收获细胞

自温箱取出培养物，以吸管打匀，转移至离心管，以 $1000\sim 1500r.p.m$ 离心 8 分钟。

五 低渗处理

吸去上清液，加 0.075 M KCl 低渗液 $6-8 \text{ m}\ell$ ，打匀，静止 10 分钟。

六 固定

向低渗的细胞悬液加入 $2 \text{ m}\ell$ 新配固定剂（甲醇 3：冰醋酸 1），打匀后如上离心 8 分钟。把上清液吸去，沿管壁加 $6-8 \text{ m}\ell$ 固定剂（不冲动细胞团），静止 30 分钟后再吸去上清液，重新更换固定剂，再静止 30 分钟。

七 气干法制片

吸去大部分固定剂，仅留下 $0.1-0.3 \text{ m}\ell$ 固定剂（视细胞的多少而定），打匀制成细胞悬液。加 1-2 滴细胞悬液至沾有冰水的玻片上，随即吹气，并以小火略加烘烤。每人制备 6-8 个标本。

八 染色

取 2-3 个标本以 Giemsa 稀释液（Giemsa 原液 $1 \text{ m}\ell$ 加 $\text{pH} = 6.8$ 的磷酸缓冲液 $9 \text{ m}\ell$ ）染色，20-30 分钟后以蒸馏水冲洗、凉干。其余标本留待作分带染色。

九 检查标本的质量

在低倍镜下观察分裂指数、细胞的大小，染色体的铺展、浓缩的程度以及其它特征。注：分裂指数是指处于分裂的细胞（前期、中期、后期和末期）占总细胞的 %。

实验报告

按“九”的内容写出实验报告。

实验六 正常人染色体核型的观察与分析

目的与要求

1. 根据细胞遗传学国际命名体制 (ISCN, 1978), 了解并识别人体细胞的常规染色体。

2. 计数并描绘人体中期染色体图象。

3. 用常规染色体显微相片进行核型分析。

4. 示教几种哺乳动物的中期染色体标本。

器材

自制的染色体标本, 描绘纸, 显微镜, 香柏油, 擦镜纸, 中期染色体相片, 核型分析版, 剪刀, 镊子, 胶水, 小鼠、田鼠、狗和兔的中期染色体示教标本。

实验内容与步骤

一、观察

先在低倍镜下自上而下, 自左至右地选择合适的中期分裂细胞, 然后转至油镜下仔细分析观察, 根据各组染色体的特征予以分组列号:

A 组这是最大的一组染色体, 它们的着丝粒在中部或几乎在中部。

№ 1 为 1 对最大的中着丝粒染色体。

№ 2 较 № 1 短些, 着丝粒接近中部。

№ 3 为 A 组中最小的中着丝粒染色体

B 组 (№ 4 - 5) 为 2 对大的亚中着丝粒染色体, 它们有明显的长臂和短臂, 一般不易使 № 4 和 № 5 染色体相区分。

C 组 (№ 6 - 12 + X) 为中等大小的亚中着丝粒染色体, 它们的大小差不多。识别该组中的最长者 (№ 6) 和最短者 (№ 12) 十分容易, 而其它染色体较难识别。一般而言, № 6、7、9 和 11 染色体的着丝粒更接近于中部; № 9 染色体的长臂有较显著的次缢痕。X 染色体的大小界于 № 7 和 № 3 染色体之间, 一般不能与 C 组中的其它染色体相区分。

D 组 (№ 13 - 15) 为中等大小的近端着丝粒染色体, 在它们的短臂上有时可见到随体。一般无法准确地识别该组中的每个染色体。

E 组 (№ 16) 为中着丝粒或稍近于亚中着丝粒的染色体, 其长度约为 № 1 染色体的 $\frac{1}{2}$, 通常很易与该组中的另 2 对染色体相区别。在着丝粒处可见一长臂缢痕, 由于它的存在使这对染色体的长度有相当大的变异。

No 1 7 为中等大小的近端着丝粒染色体，其短臂看得很清楚。

No 1 8 为 E 组中最小的一对染色体。其短臂很小，着丝粒的位置几乎与端着丝粒的染色体一样。

F 组 (No 1 9-20) 为 2 对小的中着丝粒染色体，一般不易把它们区别开。作为一个组，它们是易于识别的。

G 组 (No 2 1-22+Y) 为最小的一组端着丝粒染色体。在 No 2 1 和 2 2 染色体的短臂上可见到随体。从真实的大小而言，No 2 2 比 No 2 1 要大些，但考虑到习惯仍把较小的那对染色体作为 No 2 1，而把较大的另一对染色体当作 No 2 2。

Y Y 染色体属于 G 组，它易于与 G 组中的其它染色体相区分。它的主要特征是：1. 呈现异固缩状态，通常比同一细胞中的其它染色体着色更深些；2. 它的二条染色单体一般不作分叉状，与其它染色体 (No 2 1 和 No 2 2) 相比它的二条单体更为靠拢，几乎是相平行的；3. 在许多细胞中，Y 染色体的长臂可见到次缢痕；4. 一般来说，它比 No 2 1 和 No 2 2 染色体更大些；5. 没有随体；6. 长臂的端部之界限不清，常呈“细毛状”。在人类的所有染色体中，Y 染色体大小的变异范围最大，尽管来自同一个体的细胞，其大小是十分恒定的。

三 显微相片核型分析

把正常人中期染色体相片中的每一个染色体剪下来，按 ISCN 分组列号，并粘贴于核型分析版上。

实验报告

一 每人画 1 - 3 个中期细胞，并在每个染色体旁边注明是哪一组哪一号的染色体。

二 每人剪贴一个染色体核型相片。中期细胞贴在上半部，核型贴在下半部。

实验七 X - 染色质与 Y - 染色质标本的制备与观察

目的与要求

了解并掌握人体细胞 X - 和 Y - 染色质标本的制作方法，及其形态学的识别，初步示范荧光显微术。

器材与药品

压舌板、染色缸、载玻片、刻度离心管、滴管、荧光光源、显微镜、离心机、粗天平，载玻片，盖玻片。

96%酒精、纯酒精、二甲苯、70%、50%酒精、5NHC₂L 硫堇液，缓冲液 (pH 6.0)，0.2%的 Q M 或 Q D 染色液。

实验程序

一、取材：许多组织的间期细胞核都适于进行 X 小体和 Y 小体的检查。完整细胞的标本比切片标本更好些。重要的是应当采取新鲜而未损伤的细胞。可从细胞涂片（易于获得的是粘膜涂片）、毛发根、胚胎膜、羊水细胞、弄碎了的组织和细胞培养物作成标本。在精子中，仅能见到 Y - 小体。

一般的血涂片经纯甲醇或 95% 酒精固定后即可用于 Y 小体的观察。

二、X 小体

1. 制备涂片：以压舌板或载玻片之端部从颊部之内表面刮取粘膜（最好是把颊部左面和右面的粘膜分开，以便检出可能的嵌合体），应当把细胞核界限清楚的深上皮层的细胞用作这些涂片，使之厚厚地铺展在载玻片上，编上号码。

2. 固定：涂片不可干燥，应立即放至 96% 酒精至少固定 30 分钟（必要时可在其中保存数周），否则会改变大多数细胞的核结构。即便是较薄的涂片，也有足够的细胞粘附在载玻片上（如是观察 Y - 小体，固定的时间是 10 分钟）。

3. 固定后，使涂片在空气中干燥，这样细胞可牢牢地粘附在玻片上。避免灰尘。这样的标本如在冰箱的防尘盒中可保存长时期（数月）。

4 染色：

(1) 染色过程

- A、玻片在蒸馏水中冲洗几次
- B、5N HCl 22°C (室温也可) 水解10分钟
- C、自来水洗几次
- D、蒸馏水洗几次
- E、硫堇(thionin) 染色液30分钟。
- F、蒸馏水稍为冲洗一下(数秒钟)。
- G、在70%酒精中分色一忽儿。
- H、96%酒精1分钟, 纯酒精2次(每次1-2分钟), 二甲苯二次, 以中性树胶封片。

(2) 硫堇原液：

A、硫堇饱和液：20克硫堇溶于500ml 50%酒精。在与缓冲液混合前过滤。

B、Michaelis缓冲液

醋酸钠 9.714 克

巴比妥钠 14.714 克

加双蒸水至500ml。此液在冰箱中可保存数月。

硫堇染色液 (pH 5.7)

缓冲液(B) 28ml

1/10 N HCl 32ml

硫堇饱和液(A) 40ml

此染色液在冰箱中可保存数月。

5. 观察：

在油镜下选择完整、核质中颗粒均匀的细胞进行观察，而固缩、皱折或其它受伤的细胞排除在外；为了避免选择上的偏倚，显微镜视野中所有合适的细胞均用于计数。

人类的X染色质是小的异染色质小体(heterochromatic body), 出现在正常女性的体细胞核中, 但在男性组织中没有。其正常大小约为1μ, 大多位于细胞核之边缘。

每人分析200-400个细胞，标出阳性细胞的百分率。

三 Y - 小体

1. 玻片浸入缓冲液 (PH 6.0) 5 分钟
2. 转至 0.2% 的 Q D 或 Q M 磷酸缓冲液 (PH 6.0) 5 分钟
3. PH 6.0 的缓冲液 5 分钟
4. 用一盖玻片盖在湿玻片上，避免产生气泡

5. 在荧光显微镜下观察，如果荧光太弱，等待 10 分钟；如果荧光还嫌弱，可移去盖玻片，在染色液中再染 5 分钟，缩短在缓冲液中的分色时间 (3)，加上新的盖玻片。如果荧光太强 (此时，看不到明显的 Y - 染色质小体)，移去盖玻片，再将玻片放至新鲜缓冲液中几分钟。

6. 如果标本满意，即用石蜡或指甲漆 (nail Varnish) 封片。

如果在荧光染色后还需作 X 小体染色，可把标本放在 96% 酒精中 30 分钟，则指甲漆被溶解，盖玻片脱落。荧光染料去掉后，令标本空气干燥，然后作 X 小体染色。

观察：

在油镜下选择荧光亮的较大的核进行分析。在正常男性的细胞核中，Y - 小体为一亮点，直径约 0.3-1.0 μ 。在些某核中，可见到双份的结构。这种双生小体 (twin bodies) 在 G₁ 和 G₂ 期的核中均可见到。有时 Y 小体显得有点弥散，在大的细胞核或在淋巴细胞受刺激后进行活跃增殖的细胞中，更是如此。

Y - 小体经常位于细胞核之边缘，虽然不如 X 小体那样总是位于核之边缘。其在口腔粘膜细胞中的频率约为 25 ~ 50%，在特别优良的标本中可达 100%。

每人计数 50 个细胞，视 Y - 小体的阳性率。

实验报告

每人观察 100 个口腔粘膜细胞，统计 X - 小体阳性的细胞数。

每人观察 50 个淋巴细胞，统计 Y - 小体阳性的细胞数。

实验八 人类皮肤纹理的观察

目的与要求

通过对正常及有关病人皮肤纹理的观察，了解临床医学中常用的几种皮肤纹理的类型及其计数方法。

实验材料

放大镜、绘图纸及一些遗传病病人的皮肤纹理。

实验步骤

一 每人用一放大镜仔细观察 10 只手指上的指纹和左、右手的掌纹，依次画成简图，并分别标上指纹的类型，隆起线计数以及掌纹的名称。

二 了解有关遗传病病人的皮肤纹理

实验记录

一 每个手指的指纹类型和隆起线计数（附图）

二 左右手的掌纹。